

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-503713

第3部門第2区分

(43)公表日 平成7年(1995)4月20日

(51)Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 31/195	ACV	9454-4C	
	AAP		
	ABG		
	ABL		
	ABX		

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平5-513401
(86)(22)出願日	平成5年(1993)1月27日
(85)翻訳文提出日	平成6年(1994)7月27日
(86)国際出願番号	PCT/US93/00709
(87)国際公開番号	WO93/14750
(87)国際公開日	平成5年(1993)8月5日
(31)優先権主張番号	825, 598
(32)優先日	1992年1月27日
(33)優先権主張国	米国 (US)
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), CA, JP

(71)出願人	ザ ロックフェラー ユニバーシティ アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10021 6399 ニュ コーク ヨーク アヴェニ ュー 1230
(71)出願人	アルテオン インコーポレーテッド アメリカ合衆国 ニュージャージー州 07446 ラムジー、ウィリアムズ ドライ ブ 170
(72)発明者	ウルリッチ、ピーター シー、 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 07675 オールド タッパン、デ ウォル フ ロード 148
(74)代理人	弁理士 早川 政名

最終頁に続く

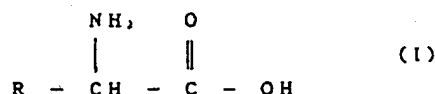
(54)【発明の名称】 蛋白質の高度グリコシル化阻害剤として有用なアミノ酸

(57)【要約】

本発明は蛋白質老化を阻害する組成物及び方法に関する。かくして本発明によれば、標的蛋白質の初期グリコシル化により生成される初期グリコシル化生成物のカルボニル部分と反応することにより、標的蛋白質の、高度グリコシル化最終生成物の生成を阻害することができる薬剤又は化合物を含む組成物が開示される。適当な薬剤は、活性窒素含有基を含むアミノ酸あるいはその誘導体であり、特にリジン又はその混合物を含むものである。本発明方法は、標的蛋白質を本発明組成物と接触させることからなる。食品劣化や動物の蛋白質老化などを処置するための、産業的及び治療的用途を有する。

請求の範囲

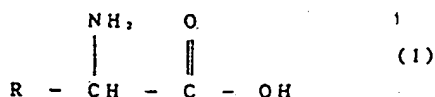
1. 動物における標的蛋白質の、高度グリコシル化最終生成物の生成を阻害して前記動物を治療する方法であって、前記動物に有効量の医薬組成物を投与することからなり、前記医薬組成物が下記式(1)の薬剤であって、



式中Rは、水素；低級アルキル基、但し任意に1個又は2個のヒドロキシル、チオール、フェニル、ヒドロキシフェニル、低級アルキルチオ、カルボキシ、アミノカルボキシ又はアミノ基で置換されてもよい；及びそれらの、生体適合性のあり薬学的に受入れられる酸付加塩；のうちから選ばれ、前記標的蛋白質の初期グリコシル化により生成する初期グリコシル化生成物のカルボニル部分と反応することができる物質である薬剤と、その担体を含むものである方法。

2. 前記標的蛋白質が構造蛋白質である請求の範囲第1項記載の方法。
3. 前記標的蛋白質が、コラーゲン、エラスチン、レンズ蛋白、血管壁、神経蛋白質及び糸球体底膜からなる群より選ばれる請求の範囲第1項記載の方法。
4. 前記医薬組成物が、前記薬剤と薬学的に受入れられる担体を含む請求の範囲第1項記載の方法。
5. 前記薬剤が L-リジンモノヒドロクロライド又はその薬学的に受入れられる塩である請求の範囲第1項記載の方法。

10. アテローム硬化症の治療に適用する請求の範囲第1項記載の方法。
11. 細胞膜硬化症の治療に適用する請求の範囲第1項記載の方法。
12. 末梢神経症の治療に適用する請求の範囲第1項記載の方法。
13. 網膜症の治療に適用する請求の範囲第1項記載の方法。
14. 白内障の治療に適用する請求の範囲第1項記載の方法。
15. 発作の治療に適用する請求の範囲第1項記載の方法。
16. 高血圧の治療に適用する請求の範囲第1項記載の方法。
17. 関節硬直の治療に適用する請求の範囲第1項記載の方法。
18. 変形性関節症の治療に適用する請求の範囲第1項記載の方法。
19. 皮膚の弾力性喪失及びシワの治療に適用する請求の範囲第1項記載の方法。
20. 関節硬化症の治療に適用する請求の範囲第1項記載の方法。
21. 糸球体腎炎の治療に適用する請求の範囲第1項記載の方法。
22. 標的蛋白質の高度グリコシル化を阻害する組成物において、下記式(1)の薬剤であって、



式中Rは、水素；低級アルキル基、但し任意に1個又は2個のヒドロキシル、チオール、フェニル、ヒドロキシフェニル、低級アルキルチオ、カルボキシ、アミノカルボキシ又はアミノ基で置換されてもよい；及びそれらの生体適合性があり薬学的に受入れられる酸付加塩；のうちから選ばれ、前記標的蛋白質の初期グリコシル化により生成する初期グリコシル化生成物のカルボニル部分と反応することができる物質である薬剤

6. 前記薬剤がDL-2, 4-ジアミノブチル酸である請求の範囲第1項記載の方法。

7. 前記薬剤がシステインモノヒドロクロライド又はその薬学的に受入れられる塩である請求の範囲第1項記載の方法。

8. 前記薬剤が3-メルカプト-D-バリンである請求の範囲第1項記載の方法。

9. 前記薬剤が4-アミノブチル酸である請求の範囲第1項記載の方法。

10. 前記薬剤が L-オルニチンモノヒドロクロライド又はその薬学的に受入れられる塩である請求の範囲第1項記載の方法。

11. 前記医薬組成物が経口的に投与される請求の範囲第1項記載の方法。

12. 前記医薬組成物が局所的に投与される請求の範囲第1項記載の方法。

13. 前記医薬組成物が軟こうの形に調製され、前記薬剤が約10重量%までの分量含まれている請求の範囲第1項記載の方法。

14. 前記医薬組成物が経口的に投与される請求の範囲第1項記載の方法。

15. 前記医薬組成物が前記動物の約25%体重までの分量で投与される請求の範囲第1項記載の方法。

16. 身体中に蓄積した、高度グリコシル化最終生成物により引き起こされる糖尿病の合併症及び老化の治療に適用する請求の範囲第1項記載の方法。

17. 糖尿病性腎臓病の治療に適用する請求の範囲第1項記載の方法。

18. 糸球体硬化症の治療に適用する請求の範囲第1項記載の方法。

19. 末梢血管病の治療に適用する請求の範囲第1項記載の方法。

と、その担体を含むこととなる組成物。

33. 前記組成物が、哺乳動物における高度グリコシル化最終生成物の蓄積により生じる糖尿病の合併症及び老化の治療に有用である前記薬剤を含む請求の範囲第11項記載の組成物。

34. 前記薬剤が L-リジンモノヒドロクロライド又はその薬学的に受入れられる塩である請求の範囲第11項記載の組成物。

35. 前記薬剤が、DL-2, 4-ジアミノブチル酸である請求の範囲第11項記載の組成物。

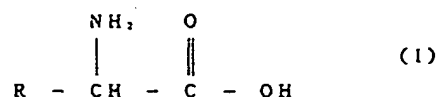
36. 前記薬剤がシステインモノヒドロクロライドまたはその薬学的に受け入れられる塩である請求の範囲第11項記載の組成物。

37. 前記薬剤が3-メルカプト-D-バリンである請求の範囲第11項記載の組成物。

38. 前記薬剤が4-アミノブチル酸である請求の範囲第11項記載の組成物。

39. 前記薬剤が L-オルニチンモノヒドロクロライドまたはその薬学的に受け入れられる塩である請求の範囲第11項記載の組成物。

40. 動物における標的蛋白質の高度グリコシル化を阻害するため前記動物に投与する医薬組成物であって、前記標的蛋白質の初期グリコシル化により生成する初期グリコシル化生成物のカルボニル部分と反応することができる、薬学的に有効量の薬剤と、薬学的に受け入れられる担体とを含む、前記薬剤が、下記式(1)で表わされ、



式中Rは、水素；低級アルキル基、但し任意に1個又は2個のヒドロキシル、チオール、フェニル、ヒドロキシフェニル、低級アルキルチオ、カルボキシ、アミノカルボキシ又はアミノ基で置換されてもよい；及びそれらの、生体適合性があり薬学的に受入れられる酸付加塩；のうちから選ばれ、前記様の蛋白質の初期グリコシル化により生成する初期グリコシル化生成物のカルボニル部分と反応することができる物質である医薬組成物。

41. 前記組成物及び薬剤が、哺乳動物における高度グリコシル化最終生成物の蓄積により生じる糖尿病の合併症及び老化の治療に有効である請求の範囲第40項記載の組成物。

42. 前記薬剤がL-リジンモノヒドロクロライド又はその、薬学的に受け入れられる塩である請求の範囲第40項記載の組成物。

43. 前記薬剤が2, 3-ジアミノコハク酸である請求の範囲第40項記載の組成物。

44. 前記薬剤がL-システインモノヒドロクロライド又はその、薬学的に受け入れられる塩である請求の範囲第40項記載の組成物。

45. 前記薬剤がメルカプト-D-バリンである請求の範囲第40項記載の組成物。

46. 前記薬剤が4-アミノブチル酸である請求の範囲第40項記載の組成物。

47. 前記薬剤がL-オルニチンモノヒドロクロライド又はその、薬学的に受け入れられる塩である請求の範囲第40項記載の組成物。

剤に関する。

グルコースと蛋白質との反応は知られている。その最初の発見は食品を調理する際の褐色化であり、これはメイラードにより1912年に確められた。メイラードはグルコースあるいはその他の還元糖がアミノ酸と反応して付加物を生成し、これは一連の脱水化及び再構成を経て安定した褐色色素を生成することを観察した。Maillard, L. D. *C. R. Acad. Sci.*, 154号、66-68ページ、1912年。

メイラードの発見に続く数年、食品化学者は仮説である反応を詳細に研究し、保蔵されあるいは熱処理された食品が、グルコースとポリペプチド類との反応の結果として非酵素的褐色化を生ずること、その結果蛋白質は架橋結合(cross linking)し、それに応じて減じられることを確認した。この時、蛋白質グリコシル化の結果として進行する褐色化にかかわる色素が、特徴的なスペクトル及び蛍光特性を有することが確かめられた。しかしこの色素の化学構造は明確に解明されなかった。

上に述べた還元糖及び食品蛋白質の間の反応は生体内(in vivo)で同様に行われていることが最近発見された。かくしてグルコースと、蛋白質の遊離アミノ基との間で非酵素的に反応して、アマドリ生成物として知られる安定したアミノ、1-デオキシケトシル付加物を生成する反応は、ヘモグロビンとの間でも生ずることがわかり、この場合、ヘモグロビンのβ-鎖のアミノ末端とグルコースとの反応による再構成により、ヘモグロビンA1cとして知られる付加物を生成する。この反応はまた種々の身体プロテイン、例えばレンズ結晶体、コラーゲン、神経蛋白質などでも生じることが発見された。Bunn, R. F. Hanes, D. N. Gibbs, J. L. R. 及び Gallop, P. R., の *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 61号、103-109ページ、1975年；Koenig, R. J., Blabstein, S. B. 及び Cerami, A., の *Maillard*

蛋白質の高度グリコシル化阻害剤として有用なアミノ酸。

関連文献

本出願人は、本発明の出願対象に関連する下記文献の共著者である：
'Covalent Attachment of Soluble Proteins by Nonenzymatic-ally Glycosylated Collagen, Role in the in Site Formation of Immune Complexes (非酵素的グリコシル化コラーゲンによる溶解性蛋白質の共有結合付着、免疫複合体のイジントウ形成における役割)、Browner, M.; Pongor S.; Cerami, A., *J. Exp. Med.*, 158号、1739-1744 ページ、1983年；'Aging of Proteins-Isolation and Identification of a Fluorescent Chromophore from the Reaction of Polypeptides with Glucose (蛋白質の老化：ポリペプチドとグルコースの反応から蛍光発色団の分離及び同定)、Pongor S.; Ulrich P.; Benasath, A. A.; Cerami, A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81号、2682-2688 ページ、1984年；'Advanced Glycosylation End Products in Tissue and the Biochemical Basis of Diabetic Complications (組織における高度グリコシル化最終生成物及び糖尿病合併症における生化学的基礎)、Browner M.; Cerami A.; Vlassara H.; *The New England Journal of Medicine*, 318号、1315-1321 ページ、1988年。これら文献は参考のために提示した。

発明の背景

本発明は全体的に、グルコースの反応に起因する蛋白質の老化に関し、より詳しくは、蛋白質の非酵素的グリコシル化及びそれにつづく高度グリコシル化最終生成物に至る反応ならびにその阻害のための方法及び薬

rd Reaction in Food and Nutrition, Waller, G. A. 編集、American Chemical Society, 225号、431-448 ページ、1983年；Monnier, V. M. 及び Cerami A. の *Clinics in Endocrinology and Metabolism*, 11号、431-452 ページ、1982年；参照。

更に、後期段階メイラード生成物のそれに類似するスペクトル特性、蛍光特性を有する褐色色素もまた生体内に、いくつかの長寿命蛋白質、例えば老人のレンズ蛋白質やコラーゲン中に観察された。加齢による色素の直線的な増加が、20乃至90才の年令の間で、人間に観察された。Monnier, V. M. 及び Cerami, A., の *Science*, 211号、491-493 ページ、1981年；Monnier, V. M. 及び Cerami, A., の *Biochem. Biophys. Acta*, 760号、97-103 ページ、1983年；及び Monnier, V. M., Kohn, R. R. 及び Cerami, A., の 'Accelerated Age-Related Browning of Human Collagen in Diabetes Mellitus', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81号、583-587 ページ、1984年参照。興味深いことに、コラーゲンの老化は、グルコースにより誘導される架橋結合により試験管内(in vitro)でも模倣されていること、また他の蛋白質の捕捉及びコラーゲンによる付加物が生成することも観察され、架橋反応により生じることが理論づけられ、これは、腎臓底部膜にアルブミン及び抗体の蓄積が観察される理由である、と信じられている。Browner, M., Pongor, S., 及び Cerami, A. の *J. Exp. Med.*, 158号、1739-1744 ページ、1983年；及び Kohn, R. R., Cerami, A., Monnier, V. M., *Diabetes*, 33(1)号、57-59 ページ、1984年参照。

最近、非酵素的架橋結合における、果糖を含むその他の天然還元糖の役割が論議された。特に、Squires等の 'Administration of an Aldose Reductase Inhibitor Induces a Decrease of Collagen Fluorescence in Diabetic Rats', *J. Clin. Invest.*, 82号、624-627 ページ、1988年、は、グルコースが先ずソルビトールに次いで果糖に至るポリオールの経

由する経路の結果、糖尿病における果糖濃度が上昇することを示している。これら研究者はまた、コラーゲンの蛍光により測定されるように、非酵素的架橋結合を生じさせる果糖の能力は、グルコースのそれよりも10倍大きい、ことを示した。本発明の方法及び薬剤は、反応性のある糖のいずれかにより仲介される非酵素的架橋結合を阻害することを目的とするのであるから、果糖により仲介される架橋結合も防止することが期待される。生体内、あるいはリボース及びガラクトースを含む食品中、に存在する他の反応性のある糖により生ずる架橋結合もまた、本発明方法及び組成物により防止される。

現出題である米国特許出願第 591, 820号 (現在米国特許第 4, 665, 192号) 及び先済Penger, S. M. ほかによる文献によれば、^{*} 蛍光発色団が単離同定され、ある種の褐色ポリペプチド、例えばウシ血清アルブミンやポリ-L-リジン中に存在すること、また2-(2-フロイル)-4-(5)-2 (フラニル)-1 H-イミダゾール、の構造を有すること、が示されている。この化合物は互変異性状態で存在し、その構造中に二つのペプチド由来アミン窒素を有することがわかった。化合物中にこのようなアミン窒素及び二つのグルコース残基を有することは、そのペプチド結合前駆体がメイラード反応の後期段階に観察される、グルコースによる蛋白質の生体内架橋結合に関係するかもしれない、ということを示唆している (Chang, J. C. F., Ulrich, P. C., Bucala, R. 及び Cerami, A., *J. Biol. Chem.*, 264号、7970-7974 ページ、1989年、参照)。この発色団により、高度グリコシル化最終生成物の同定が可能であり、更に、蛋白質老化プロセスを明かにすること、その阻害方法及び薬剤を開発するための特定の化学的方向を定めることができる。本出題の方向はこのような目的に資するようにする。

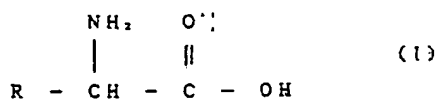
ごく最近、他の高度グリコシル化生成物が同定された。例えばFarnes

ほかの米国特許出願 097, 856号、出願日：1987、9、17；ピラリン (ハヤセほか、^{*} Aging of Proteins: Immunological Detection of a Glucose-derived Pyrrole Formed during Maillard Reaction in Vivo', *J. Biol. Chem.*, 263号、3758-3764 ページ、1989年)、ベントシジン (Sell, D. 及び Monnier, V. 'Structure Elucidation of a Senescence Cross-link from Human Extracellular Matrix', *J. Biol. Chem.*, 264号、21591-21602 ページ、1989年)、参照。これらの高度グリコシル化生成物の生成は、本発明方法及び薬剤により阻害されよう。即ち本発明はこれら特定の高度グリコシル化最終生成物のいずれかに限定されるものではなく、蛋白質と糖との反応の結果としてのそれらの生成物生成の全体のプロセスにかかわる。

本発明の要約

本発明によれば、蛋白質老化阻害のための方法及び薬剤が提供される。特に、高度グリコシル化最終生成物の生成に基づく蛋白質老化を阻害する薬剤が、グルコースと蛋白質との反応による初期グリコシル化生成物と反応することができ、それ以上の反応を防ぐ物質のなかから選ばれる。かくして、例えば、ヒドラジン基などの活性窒素含有置換基を有する化合物あるいは組成物が、理論的には適当であり、アミノグアニジン、 α -ヒドラジノヒスチジン及びリジンなどの化合物が適当であることがわかった。これら薬剤は、初期グリコシル化生成物の反応性カルボニルと反応し、それにより、蛋白質架橋結合を導く高度グリコシル化最終生成物の生成を阻害するように見える。

本発明に使用するために特に適当な薬剤は下記式を有するアミノ酸及びその誘導体であり、



式中Rは、水素；低級アルキル基、但し任意に1個又は2個のヒドロキシル、チオール、フェニル、ヒドロキシフェニル、低級アルキルチオール、カルボキシ、アミノカルボキシ又はアミノ基で置換されてもよい、及びその生体適合性があり薬理学的に受け入れられる置換基、のうちから選ばれる基から選択される。

ここで述べられる低級アルキル基は、炭素原子を1-6個有し、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル及び枝分かれのある対応する異性体を含む。

使用されるアミノ酸は、L & D 立体化学的構造を有するか、その混合物として使用されるものであるが、L 構造のものが好ましい。

本発明の式1化合物の均等物は、生体適合性があり薬理学的に受け入れられるその塩である。このような塩は種々の無機酸及び有機酸、例えばメタンスルホン酸、塩酸、トルエンスルホン酸、硫酸、マレイン酸、酢酸、リン酸及び関連する酸のうちから選ばれる。

式1の化合物のうち、ある種の置換体が好ましい。

本発明の代表的な化合物は、リジン；2, 3-ジアミノコハク酸・シスチン、及びこれらの生体適合性があり薬理学的に受け入れられる塩である。

本発明はまた、初期グリコシル化生成物の段階で初期グリコシル化蛋白質を、本発明薬剤の一種または数種のある量と接触させることにより、蛋白質老化を阻害する方法に関わる。本発明方法に産業上の有用性を発

揮するため、特定食品の早過ぎる老化及び劣化を避けるよう、薬剤の一種あるいは数種を問題の蛋白質に適用する。その際、蛋白質抽出物の場合にはその混合物に薬剤を導入し、蛋白質を含む食品の場合、薬剤を塗布あるいは導入する。

治療用途に用いる場合、治療すべき動物宿主に適当な薬剤形態で薬剤の一種又は数種を投与する。投与の方法は既に知られた方法で行えばよく、例えば経口的、局所的あるいは腸管外方法、例えば皮内注射、皮下注射、静脈注射、腹腔内注射、あるいはその他の慣用手段によって行う。薬剤投与量は長期間にわたり、例えば1kgあたり約25mgまでの投与量度であってよい。

高度グリコシル化最終生成物の生成阻害能は、蛋白質老化が重大な障害をもたらす様々な分野で利用価値が見出される。食品工業では食品劣化を遅延させることにより経済的、社会的な利益が得られることは明らかである。同様に、蛋白質の劣化が問題となる他の工業分野でも、そのような蛋白質を含む組成物中に本発明薬剤を混合させその利用可能寿命を延長させることにより、利益が得られる。今日利用されている食品保存剤や変色防止剤、例えば動物におけるアレルギーやぜん息を含む中毒症状を引き起こすことが知られている二酸化イオウ、などはここに記載されている化合物でとって代わられるかもしれない。

本発明方法は特有の治療用途をもつ。なぜならメイラード反応プロセスは身体、特にコラーゲン、エラスチン、レンズ蛋白質、腎臓糸球体膜における蛋白質に重大な影響を与えるからである。これら蛋白質は加齢と共に劣化し (従って "蛋白質老化 (protein aging)" なる用語を用いる)、また糖尿病の糖発症として劣化する。従って高度グリコシル化最終生成物の生成を遅延させるか実質的に阻害しうること、は、糖尿病の症状を治療しうる期待を抱かせると共に、動物寿命の延長

とその質の改善をもたらすことになる。

従って本発明の主たる目的は、蛋白質と、グルコースあるいはその他の還元糖との反応の最終的な結果として生じる蛋白質の広範な架橋結合を阻害することにより、高度グリコシル化最終生成物の生成を阻害する方法を提供することである。

本発明の別の目的は、初期グリコシル化生成物との反応により特徴づけられる上記方法を提供することである。

本発明の別の目的は、前記高度グリコシル化最終生成物の生成をもたらす前記初期グリコシル化生成物の再構成と架橋結合を防止する方法を提供することである。

本発明の更に別の目的は、上記方法における前記初期グリコシル化生成物の反応に關与しうる薬剤を提供することである。

本発明の更に別の目的は、動物蛋白の醗化及び食品の褐色化並びに劣化をもたらすことが明らかな蛋白質老化の悪影響に対処する方法を提供することである。

その他の目的及び利点は、図面を伴う以下の説明を読むことにより当業者には明らかであろう。

図面の簡単な説明

第1図は、試験管内で、過剰のグルコースと反応したアルブミンにおける高度グリコシル化の生成を阻害することを目的とした研究の結果を示すグラフである。

第2図は、コラーゲンのような構造蛋白質のグリコシル化による蛋白質の捕捉及び蓄積を阻害することを目的とした研究の結果を示すグラフである。

第3A図は、本発明の薬剤による処理をする場合及びしない場合のグ

用することに基礎をおく。理想的な薬剤は、発色団の生成及びそれに伴う蛋白質と蛋白質との架橋結合、及び動脈や腎臓中で生じているような他の蛋白質上への蛋白質の捕捉等を阻害するものである。

本発明は初期蛋白質グリコシル化の阻害を意図するものではない。なぜなら、グルコースと蛋白質アミノ基との反応を防ぐ薬剤を使うことは殆んど不可能であるからである。初期グリコシル化を防ぐことのできる薬剤は、毒性が極めて高く、また初期グリコシル化は約3週間で平衡に達するため、この目的を達するためには時間的に不十分である。これにかわり理想的な薬剤の場合、老化及び糖尿病に關する病理の直接原因である最終的な進行グリコシル化生成物の生成を導く、長期間の後期グリコシル化段階を防止あるいは阻害することを意図する。

本発明化合物が反応すると考えられる初期グリコシル化生成物の化学的性質は理論上のものである。高度グリコシル化生成物の生成に關係すると考えられ、本発明化合物との反応により阻止されるカルボニル部分、を有する初期グリコシル化生成物について、仮説が考えられている。一つは、アマドリ生成物の反応性カルボニル部分もしくはその脱水及び/または再構成生成物が結合して高度グリコシル化最終生成物を生成するというものである。提案された別のメカニズムは、アマドリあるいはその他の初期グリコシル化生成物の開裂からのカルボニル部分(例えばグリコアルデヒドあるいは3-デオキシグルコソン)を含む反応性カルボニル化合物を生成し(例えばGottschall, A., 1972年, *The Glycoproteins* (Gottschall A. 編集), Part A, 141-157 ページ, Elsevier Publishing Co., N.Y.; Reynolds, T.M., 1965年, *Adv. Food Res.*, 14号, 167-283 ページ参照)、引きつづくアミンもしくはアマドリ生成物との反応により、カルボニルを含む高度グリコシル化生成物、例えば先述Farnetほかにより記載されるアルキルホルミルグリコシルピロールなどを生成す

ルコースと保温したコラーゲンの可溶化の度合いを示すグラフである。

第3B図は、本発明の薬剤で処理をする場合及びしない場合のグルコースと保温したコラーゲンの異化シアシ処理後の蛋白質断片の分離を示すポリアクリルアミドゲルの写真である。

第4図は、本発明の薬剤が一定量投与された糖尿病のラットの腎臓糸球体底部膜に結合した蛋白質の程度を検査する生体内の研究の結果を示すグラフである。

好ましい実施態様の詳細な説明

本発明によれば、動物体及び植物体の双方に存在する種々の標的蛋白質における、高度グリコシル化最終生成物の生成を阻害する組成物及び方法が開発された。本発明は特に、蛋白質の初期グリコシル化段階で生成する初期グリコシル化生成物のカルボニル部分と反応させることにより、標的蛋白質の高度グリコシル化最終生成物の生成を阻害することのできる一種又は数種の薬剤を含む組成物に關わる。

初期グリコシル化生成物の糖部分と蛋白質部分の結合部近くに位置するカルボニル基は、蛋白質の架橋結合を生起させて高度グリコシル化最終生成物を生成する活性部位を有すること、また生体内で皮膚のしわ、ある種の腎臓病、アテローム硬化症、変形性関節症などの進行をもたらすことが明らかな他の蛋白質の捕捉、に寄与することが理論化されている。かくしてこのカルボニル部分と本発明化合物とを反応させることにより、後期メイラード効果を阻害し、上述のような有害な変化に干渉することができると考えられる。

本発明の原理は、糖尿病の症状及び老化と關係するかこれに導くような、Pamgarほか(先述)及びFarnetほか(先述)等により同定された螢光発色団の生成をもたらす後期グリコシル化段階を阻止する薬剤、を便

るというものである。

高度グリコシル化生成物生成のメカニズムについて幾人かの研究者が研究をした。エブル(Eble)ほかの試験管内研究である'*Hexose-matic Glycosylation and Glucose-dependent Cross-linking of Proteins*', *J. Biol. Chem.*, 252号, 9409-9412 ページは、グルコースの存在しない状態における非グリコシル化蛋白質とグリコシル化蛋白質の架橋結合について記載している。エブルほかは、メイラード反応のメカニズムの解明をこころみ、RHAaseモデル系として、その初期グリコシル化を制御された状態で実施し、次いで様々な条件下で検査した。

一つの局面では、グリコシル化蛋白質材料を分離してグルコースのない環境下におき、架橋結合の範囲を観察した。エブルほかは、グリコシル化蛋白質のみならず非グリコシル化蛋白質についても、架橋結合の発生が継続することを観察した。エブルほかにより注目された観察の一つは、グルコースと蛋白質材料との反応が蛋白質鎖のアミノ酸の位置で生じるように見えたことである。これについてエブルらが実施した確認試験の結果、遊離リジンは、グルコースと結合するためRHAaseのリジンと競合するということがわかった。これらのデータからリジンは高度グリコシル化の阻害剤として機能するということが推論できるかもしれない。しかしこの結論及び根拠となる観察結果は、エブルらにより準備され検査されたモデル系の比較的限定された資料に基づくものであることを考慮する必要がある。明らかなことではあるが、エブルほかは、生体内及び試験管内の双方で蛋白質の高度グリコシル化を阻害することに関する本発明の基礎となる発明を認識しておらず、また示唆もしていない。

エブルほかの実験は、グルコースが常に存在する高度グリコシル化最終生成物の生体内生成における反応性開裂生成物メカニズム(reactive cleavage product mechanism)

あるいはその他のメカニズムを示唆するものではない。実際他の研究者達は生体内における高度グリコシル化最終生成物の生成を説明するこのメカニズムを支持している(例えばHayaseほか、1989年、既述; Sell及びMouaier、1989年、既述; Dimoniほか、*Agric. Biol. Chem.*、53(6)号、1727-1728 ページ、1989年; *Diabetes Research and Clinical Practice*、6号、311-313 ページ、1989年、参照)。エプル等のモデル系における阻害剤としてのリジンの使用は、生体内でグルコースの存在下における高度グリコシル化最終生成物の生成の阻害及び糖尿病余病や老化の改善に関する本発明化合物の有用性に何等の影響を与えるものでない。

さて、本発明において有用な組成物は、初期グリコシル化生成物の活性カルボニル中間物と反応することができる薬剤からなるまたは含む。適当な薬剤は活性窒素含有基あるいは置換基、例えばヒドラジン基、を有する化合物である。薬剤はまたアミノ酸及びそのエステルならびにアミドから少くとも部分的に由来するものである。なぜならこのような化合物は、接触する標的蛋白質と一般的に生体適合性を有するからである。例えば、薬剤は、アミノグアニジン、 α -ヒドラジノヒスチジン、リジンあるいはこれら薬剤又は化合物の混合物を含むものであってよい。これら薬剤あるいは化合物のそれぞれは、初期グリコシル化生成物のカルボニルと反応すると考えられる活性窒素含有置換基を有する。かくして薬剤と、蛋白質のグリコシル-リジン部分との反応によって、この部分が他の基と架橋結合することが阻止される。

Harris及びStrickbergerは、*Diabetologia*、28号、282-5 ページ、1985年において、酵素ヒスチジンジカルボキシラーゼの公知阻害剤である α -ヒドラジノヒスチジンの生体内投与により、ラットの動脈のアルブミンの蓄積が減少することを見出したことを記載している。著者はこの薬剤がこの組織におけるヒスタミンの生産を減少させる作用をするこ

と、また従ってヒスタミンがアテローム硬化症に關する低濃度リポ蛋白質蓄積の媒介物であること、を提案している。これと対比的にアミノグアニジンはヒスタミンの濃度を増加させることが知られており(Lindbergほか、*Acta Obst Gynecol Scandinar*、45号、131-139 ページ、1966年)、 α -ヒドラジノヒスチジン及びアミノグアニジンは、ヒスタミン濃度に及ぼす影響が相反している。従って、 α -ヒドラジノヒスチジン及びアミノグアニジンの双方が生体内及び試験管内で蛋白質架橋結合を減少させる効果を有するという本発明の基礎となる発見は、著者等の視野に入っていないものであり、従って著者であるHarris及びStrickbergerらにより提案されるメカニズムは、高度グリコシル化最終生成物生成を減ずる作用を有する本発明化合物にかゝる説明のそれと、まったく異なったものである。更に、Harris及びStrickbergerの発見は本発明の概念及び利用とは異なっている。なぜなら彼等により示唆されている、 α -ヒドラジノヒスチジンによるヒスタミン合成抑制メカニズムは本発明の基礎をなす概念と機能的な相違があり、實際上疑問の点があるからである。

本発明薬剤は、初期グリコシル化生成物のカルボニル部分と反応して高度に安定な付加物をつくるというその能力をたしかめ試験を重ねたものであり、Harris及びStrickbergerの研究から示唆できるものではない。

アミノグアニジンなる化合物は動物体中で低度の毒性を示すことが知られている。化学物質の毒性に関する1978年登録データによれば、アミノグアニジン塩基は、ラットに1250mg/kg、マウスに960mg/kgを皮下投与した時、LD50を有する。その塩酸誘導体をラットに2940mg/kg皮下投与した時、LD50であった。後者の化合物の毒性は極めて低いものである。

本発明組成物を生体内あるいは治療目的で利用する場合、これに含ま

れる化合物あるいは薬剤は生体適合性のあるものであることに注意すべきである。医薬組成物は、本発明薬剤又は化合物を薬理学的有効量と共に、目的に沿うような公知物質のうちから選んだ治学的に受け入れられる担体を使用して調製する。このような組成物は投与形態に応じ種々の形に調製することができる。例えば、アミノグアニジンは、溶解度を高め、腹腔内注射による刺激をより少なくするために、塩酸塩から市販されている炭酸塩にまでわたっていてもよい。また投与が静脈注射あるいは腹腔内注射により行われる場合には液体の形にしてもよく、一方口腔内投与のためには錠剤、カプセルなどにしてもよい。皮膚に適用するためには、皮膚中に透入するのに役立つ担体を用いてローションあるいは軟こうの形にしてもよい。他の身体組織へ投与するための他の適当な形も考えられる。

本発明はまた標的蛋白質を本発明組成物と接触させることを含む、高度グリコシル化最終生成物の生成阻害方法にかかわる。標的蛋白質が、動物性であれ植物性であれ食品に含まれている場合、本発明薬剤を含む組成物を種々の慣用手段で食品に適用してもよい。治療用途が意図される場合、治療される動物に本発明医薬組成物を定期的に一定量投与すればよい。投与は例えば毎日行われ、投与量は、動物体重1kgあたり15mgまでであってよい。局所的な使用の場合、例えば10%までの本発明薬剤を含む軟こうあるいはローションを皮膚に適用する。当然ながらこのような値にはある程度変動があってもよく、記載した数値は、発明の実施のための最良の形態を開示すべき出願人の義務を果たすために提示されたものである。

本発明の背景の説明から明らかなように、本発明方法及び組成物は、動物、植物双方におけるキーとなる蛋白質の老化を抑制することを意図し、同時にその結果として経済的及び医学的な利益が得られるようにす

る。食品の場合、本発明組成物を適用することにより食品劣化を遅延させ、それにより保存寿命を延長し、消費者により多大な有益性をもたらすものである。人体にアレルギーや喘息を生じさせることが知られている二酸化イオウなどの現在使用されている防腐剤に代って、本発明により非毒性の生体適合性のある化合物を使うことができるのである。

本発明の治療方向は老化プロセスの阻止であり、この老化プロセスは既に述べたように高度グリコシル化及び架橋結合によるキーとなる蛋白質の老化であることが確かめられている。かくして身体蛋白質、特に身体構造蛋白質、例えばコラーゲン、エラスチン、レンズ蛋白質、神経蛋白質、腎臓糸球体基底膜などはすべて、本発明を実施することによりその寿命の延長及び活性に好影響が得られる。本発明はかくして標的蛋白質の架橋結合による蛋白質の捕捉から生じる例えば網膜症、白内障、糖尿病性腎臓病、糸球体硬化症、末梢血管病、閉塞性動脈硬化症、末梢神経障害、発作、高血圧、アテローム硬化症、変形性関節症、大動脈硬化、皮膚の弾力性欠損及びシワ、関節硬化、糸球体腎炎等の病理状態の発生を減じる。また、これら病的状態のすべては患者が真性糖尿病に悩んでいることを示す徴候である。かくして本治療方法は、高齢によるあるいは上記病理状態に悩む患者の治療に關する。

高度グリコシル化生成物生成をもたらす蛋白質架橋結合は、血盲症におけるコラーゲンなどの構造蛋白質の溶解性(Browlleeほか、*Science*、232号、1629-1632 ページ、1986年、参照)や、コラーゲンへのリポ蛋白質の結合などの捕集血清蛋白質の溶解性を減じる。またこれは、内皮下基質における出血血漿蛋白質の共有結合捕集や、酵素による血漿蛋白質及び基質蛋白質の生理学的な滅成への感受性の減少という結果ももたらし得る(Browlleeほか、*Diabetes*、35号、補巻1、42Aページ、1986年参照)。これらの理由のため、慢性高血糖症により引き起こされる糖

尿病血管の進行性閉塞は、グルコース由来の架橋結合の過度の生成に基づくと考えられている。このような巨大血管病変や末梢血管閉塞は、本発明による組成物及び方法を用いて高度グリコシル化生成物を化学的に阻害することにより、有効に阻止しうる。

他の研究により、標的器官の慢性の糖尿病損傷の進行が、主として高血糖症に関連しており、厳格な代謝制御により末梢器官損傷を遅らせるか阻止さえすることが明らかになっている。Nichol-Isは、*Lab. Invest.*, 60(4)号、486ページ、1989年、ネズミの糖尿病腎症における小島同質移植 (islet isografting) 化及びアミノグアニジンの効果を論じている。これらの研究は、本発明の薬剤であるアミノグアニジンが、糖尿病ラットの腎臓系球体底部膜における蛋白質架橋結合を減じることを明らかにし、またBovaletらの*Science*, 232号、1629-1632ページ、1988年、における先の研究を、糖尿病の併発症における別の標的器官に適用することにまで及んでいる。別の研究では、アミノグアニジンにより腎臓における免疫グロブリン捕集が減少することを示している (Bovalet ら、*Diabetes*, 38号、補巻1、42Aページ、1989年)。

別の実証は、糖尿病性腎臓病の証拠である腎臓中の形態学的変化について提出された同様のBovaletほかの論文 (1988年) において、アミノグアニジン投与が、ストレプトゾトシン-糖尿病ラットモデルにおいて糖尿病性腎症の進行を阻止すると述べていることである。これらの研究者は、末期段階の糖尿病性腎臓病の主たる構造的異常である糸球体底部の膜厚増大が、アミノグアニジンにより阻止されたことを報告している。これらのデータは、本発明により教示される高度グリコシル化最終生成物の生成を阻害することにより、糖尿病による初期病変及び後期病変、また老化過程でグリコシル化最終生成物の生成に起因する変化が阻止される

ことを示唆している。

より硬化した細胞膜形成を招く赤血球細胞変形の糖尿病に由来する変化は、架橋結合の別の証拠であり、アミノグアニジンはこれを生体内で阻止する、ことがわかっている。

糖尿病ラットにおけるコラーゲンの架橋結合の増大は、アミノグアニジンにより示されている。Orland及びAndreassenは、“糖尿病ラットにおけるコラーゲンの生化学的及び生体力学的安定性の増大は、アミノグアニジン治療により阻止される”なる論文、糖尿病研究に関するヨーロッパ協会、第25年次大会、525Aページ、抄録第311号、1989年において、その効果を、酸塩基の熱安定性を尿素浴中で破壊時間及び機械的強度を評価した際に、示している。Soulisほかは“アミノグアニジンは糖尿病ラットにおける組織の蛍光を減じるが、蛋白尿を減じない”なる論文、老化、糖尿病、及び栄養におけるメイラード反応に関するHII会議、において、蛍光及び溶解度により測定した大動脈のコラーゲンに対し、同じ効果が得られたことを報告している。

Gisbione及びBovaletは、“アミノグアニジン治療により長期にわたるストレプトゾトシン-糖尿病ラットにおける腎臓のラミニンB1 mRNAの増大した安定状態を正常化する”なる論文において (*Diabetes*, 38号、Supplement 2: 83A、アメリカ糖尿病学会第49年次総会、1989年)、糖尿病ラットに対するアミノグアニジン治療により腎臓中のラミニンB1 mRNAの糖尿病に由来する上昇を阻止したことを示している。このことは、アミノグアニジンが、腎臓その他の器官における底部膜の肥厚化、血管の形態的、機能的劣化を引き起こす基質の過剰生成を阻止するかもしれないことを示している。

糖尿病の別の影響は、通常慢性糖尿病と関係する骨形成の減少をもたらす骨基質分化に及ぼす高血糖症の作用である。動物モデルでは、糖尿

病は、基質骨質分化を10%減少させ、試験管モデルでもこの影響を再現する。アミノグアニジンはこのモデルにおける骨形成減少を防止する。

実施例 I

生体内における高度グリコシル化最終生成物の生産を阻害する本発明薬剤の効果を測定するため、アルブミンとグルコースを2週間、いくつかの試験薬剤の存在下に保温した。試料を分析のため定期的に採取した。高度グリコシル化最終生成物を、蛍光化合物の出現を指標として測定し、初期グリコシル化生成物は、放射線ラベルグルコースをアルブミンに組込むことにより測定した。反応条件は以下の通りである。夫々混合物は、6 μ l/ μ lウシ血清アルブミン、200 μ Mグルコース、200 μ M試験薬剤 (塩酸アミノグアニジン、 α -ヒドラジノヒスチジン、又はリジンのいずれか) 及びpH 6、0.5 Mりん酸緩衝液中で 14 C-グルコースを1分あたりはほぼ 1×10^6 カウントを含んでいた。放射線ラベルグルコースは使用前に予備洗浄し、アルブミンと反応して初期グリコシル化生成物生成の速度を誤った結果に導くような異物を除去した。反応混合物を17°Cで保温し、試料を0.5、1.0、1.5及び2週間後採取した。対照混合物はグルコース又は薬剤を含まないものであった。

保温期間後、試料を以下のように処理した。未結合グルコースを除去するための透析後、存在する蛋白質量を標準的な染料結合アッセイにより測定した。アルブミンに結合したグルコースの量、即ち初期グリコシル化生成物の量は、トリクロロ酢酸と共にアルブミンを沈殿させることにより測定し、結合したグルコースの放射能は、シンチレーションカウンティングにより測定した。高度グリコシル化最終生成物は、親出題である米国特許出願第590,120号、及び既述Poeperらが記載していた方法により定量した。阻害剤と共に付加物を形成する結果これら数値がシフ

トしていないことを確かめるため、すべての試料について、励起極大及び放出極大についてスペクトル測定した。

結果は、グルコースとアルブミンが反応して、保温 (グルコース+15 μ l) して0.5、1.5及び2週間後、大量の蛍光性の高度グリコシル化最終生成物を生成することを示している。200 μ Mのアミノグアニジンを含有させた場合、対照試料の2週間保温 (85A+グルコース+1.52) 後と比較すると、蛍光化合物の生成について8倍の減少がみられた。

実施例 II

蛋白質架橋結合阻害に及ぼす薬剤の影響をより正確に測定するため、不溶蛋白質に溶解蛋白質が試験管内で結合する程度を測定するアッセイ装置を考案した。このアッセイ装置は組織内で生じる事象、即ち血管外基質において蛋白質に血清蛋白質が結合し、蛋白質の蓄積を生じ、いくつかのその他組織における血管腔を狭める事象を模倣するものである。生体内におけるこのような事象は腎臓病やアテローム硬化症を生起させ、糖尿病や老化に関連する性状を導く。

蛋白質捕集 (即ち結合又は蓄積) を測定するため、ゼラチン (コラーゲンを活性化アガロースビーズ (Alligel 10、バイオレード研究所製) に通常の方法で結合させた。結合後、ビーズの残るすべての活性部分は、グリジニエチルエステルとの反応により失活させた。

ビーズを、ウシ血清アルブミン及び100 μ Mグルコース-6-リン酸塩で2週間保温したところ、グルコースよりも迅速に蛋白質と初基グリコシル化生成物を生成するより反応性の高いグルコース体が得られた。いくつかの実験で200 μ Mの試験薬剤、アミノグアニジン、 α -ヒドラジノヒスチジン、又はリジンを加えた。ウシ血清アルブミンを放射線ラベルしてビーズに結合する量が測定されるようにした。ビーズに結合する放

射線ラベル量が蛋白質捕集の直接測定値である。

この反応性混合物を2週間保温後、ビーズをカオトロビズム剤で洗い、共有結合放射線活性を測定した。

リジンもまたアミノグアニジンのそれと同様の程度に蛋白質捕集量を減じる(示されていない)。試験結果は、これら化合物が膜その他の組織に対する溶解蛋白質の生体内捕集を減じさせること、またこれら薬剤が糖尿病や老化の病理を減じる効果があることを示す。

実施例Ⅲ

蛋白質捕集、架橋結合及び高度グリコシル化最終生成物の生成を防止するモデルとしてのアミノグアニジンの別の評価のため、牛真皮コラーゲンをを用いた以下の実験を行った。コラーゲンは皮のしなやかさに関与する皮膚蛋白質であって、これの架橋結合は、シワの形成、弾力性減少、蛋白分解性その他の変化を招来する。

ウシ皮試料からのコラーゲンを酢酸中に抽出し、0.6 Mの塩化ナトリウムと共に沈殿させた。この処理により、溶液から、既に永久的に架橋結合しているが変性している皮コラーゲンが除かれた。天然のコラーゲン原線維を0.01Mリンド酸緩衝液で透析することにより新しくし、次いで200 mMアミノグアニジンと共に、あるいはアミノグアニジンを使わずに、140 mMグルコースの存在下で、35℃の温度で3週間保温した。保温後、試料を透析し次いで架橋結合の程度を二つの方法で測定した。生ず、100℃の2%ドデシル硫酸ナトリウム中で処理することにより溶解する反応したコラーゲンの量を測定した。

グルコースとアミノグアニジンで保温したコラーゲンは、緩衝液だけの中で保温したコラーゲンと同様の溶解性があった。これと対照的に、アミノグアニジンを用いずグルコース中で保温したコラーゲンは50%し

か溶解しなかった。このことは、皮その他の組織における年令に關係する変化をアミノグアニジンが防止することを示す別の証拠である。

反応したコラーゲンは、ギ酸中の臭化シアン処理を行って破片化することにより更に検査した。得られた蛋白質断片をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、サイズ別に分けた。電気泳動後、銀染色法を用いてゲル中の蛋白質部分を同定した。

以上の結果は、アミノグアニジンが、コラーゲンをグルコースで保温した時に生じる架橋結合の量を減ずること、またこの薬剤を局部的に適用することにより、弾力性の減少及びシワの形成を含む年令に關係する変化を防止しうることを示している。

上記の試験管内実験はすべて、グルコースあるいはその他の還元糖の存在下で保温された蛋白質から試験管内で形成される高度グリコシル化最終生成物の生成阻害剤として、アミノグアニジンが有用であることを示している。身体内にはグルコースが存在しており、糖尿病の場合量が増加しており、身体中では架橋結合が行われ、高度グリコシル化最終生成物であることを示す蛍光化合物が生成されることがわかっているから、この薬剤を生体内で使用することは、糖尿病と関連する病理及び老化の過程で生じる変化の防止に有用であることが推論される。

かくして本発明の仮説を生体内で試験すべく、以下の実験を行った。

実施例Ⅳ

生体内における高度グリコシル化最終生成物の濃度を測定するため、ラットの腎臓の、糸球体底部膜に結合した血清蛋白質について検査した。これは良好なモデルであることがわかった。なぜなら、この器官の血管外基質における出血蛋白質形成の結果、未治療糖尿病における著しい病理状態が生じることが観察されるからである。

実験は、正常ラット及び糖尿病ラットに対し、毎日、身体重量キログラムあたり25mgの塩酸アミノグアニジン薬剤を16週間腹腔内投与することにより行った。アミノグアニジンの塩酸塩は、もとの遊離塩基化合物よりも溶解性があり刺激性が小さいために使用された。薬剤投与前に糖尿病を一回のストレプトゾトシン投与により生じさせた。比較例である正常ラット及び糖尿病ラットには薬剤投与は行われなかった。薬剤治療終了後、ラットは殺されて腎臓を除去した。夫々の器官をその被膜から除去し、髄質を除去した。主として糸球体からなる組織残部をドライアイスで凍結し、-70℃で保存した。各処置群毎に5匹のラットの組織を標本とした。

糸球体底部膜を準備するため、組織をスライスし、一連のふるい分けをし(170、100及び270)、文献に見られるように(Beisswenger, P. J., Spitz, R. G., *Diabetes*, 22号、186-193 ページ、1973年)、細管その他の望ましくない組織構成成分から分離した。糸球体それ自体は80-90%であることがわかった。最終的な試料を求め、15分間1500rpmで遠心分離して糸球体をベレット化し、-70℃で冷凍した。

融解した糸球体をBioson Sonifier 200型細胞粉砕機で、氷の上で1分間の間隔を4回おいて粉砕した。試料を相コントラスト顕微鏡で検査して、糸球体すべてが粉砕されていることを確かめた。次に糸球体底部膜を3000rpmで10分間遠心分離を行うことによりベレット化し、1 M塩化ナトリウムで、次いで蒸留水で、洗浄した。清浄化した糸球体底部膜の残るベレットは冷凍し、凍結乾燥した。

酵素免疫アッセイ法を用いて、薬剤処理した後のあるいは薬剤処理しない正常ラット及び糖尿病ラットの糸球体底部膜に結合した、血清免疫グロブリンG (IgG) の量を測定した。IgGを測定するため、凍結乾燥した糸球体底部膜組織の6mg試料を、pH 6.0の0.05M炭酸緩衝液の0.5 ml

中に懸濁し、アルカリリン酸塩に共役結合したラット抗-IgG抗体の1:5,000希釈液(Dynatech社製)の0.5 mlを加えた。この混合物をポリスチレン管中で一晚保温した。このポリスチレン管は、リン酸塩で緩衝された食塩水(PBS)中に溶かした3%ヤギ血清プラス0.05% Tween 20中で2時間保温することにより、あらかじめブロックし、次いでPBS プラス Tween で2回ゆすいだ。

一昼夜保温することにより抗体を、糸球体底部膜に架橋結合したいずれかのIgGに結合させた後、膜を5分間3200rpmで遠心分離することによりベレット化し、未結合抗体-酵素共役物をPBS プラスTween で4回ゆすぎ次いで蒸留水で3回すすぐことにより洗った。結合した抗体-酵素結合物の量を測定するため、0.5 mlの基質溶液(10%ジエタノールアミンに溶かした1mg/mlパラ-ニトロフェニルフォスフェート、pH 8.1を含む)を添加し、室温で30分間保温した。反応は0.2 mlの水酸化ナトリウムを添加することにより停止し、400 nmにおける吸収を測定した。

糖尿病ラットは糸球体底部膜("D")に結合したIgGを高濃度であり、正常ラットの量("N")はその約1/5であった。塩酸アミノグアニジンを毎日投与された糖尿病ラットのIgGは正常ラット("D+I")と同じ低い濃度であった。薬剤を投与されない正常ラット("N+I")も同じ濃度の低さであった。

これらの実験は、アミノグアニジンが、ラットの糸球体底部膜に対するこの血漿蛋白質の捕集及び蓄積を阻止すること、を示している。おそらく、腎臓、静脈壁、その他糖尿病等により影響を受けることが知られている組織におけるこの蛋白質あるいはその他の血清蛋白質の捕集もまた、同様に減少する、と考えられる。静脈壁におけるリポ蛋白質の捕集は、アテローム硬化症を引き起こすことが知られている。

試験管内実験に加え、これらの生体内実験結果は、この種の薬剤治療

が、蛋白質の高度グリコシル化、及び蛋白質その他の巨大細胞相互の架橋結合形成と結びついた症状の阻害を効果があることの裏証している。この薬剤治療は、腎臓病、高血圧症、網膜損傷、腱、韧带、関節等の血管外損傷、を含む動脈疾病などの合併症を導く糖尿病や老化の場合に生じる、蛋白質の増大した構築及び架橋結合を阻害するために使用される。この治療は、糖尿病や老化に伴うアテローム硬化症や結合組織変化を遅延させるためにも行われる。治療は局部的あるいは全身的に行ってよく、投与の形態は局部的、経口的、腹腔内投与であってもよい。

実施例V

上記実施例IVに記載される動物の同じ群からの動脈試料を、高度グリコシル化最終生成物 (AGE) の内容及び溶解度の分析のため使用した。

動脈を切開はさみで細かくミンチし、5 mlのクロロホルム・メタノール (2:1) を加え、緩衝液で5回洗浄し、小部分に分割して、架橋結合のための以下の評価に供するようにした。

(A) プロテアーゼK及びペプシンによる完全な可溶性後コラーゲンの特定の蛍光。

(B) 15℃で2時間の抽出及び4℃で24時間の抽出後、0.5 M酢酸中の溶解度を決定した。

(C) 10度Cで18時間具化シアン開裂後の溶解度を決定した。

(D) 31度Cで48時間後、pH 1 の0.1 M酢酸塩緩衝液に溶かしたペプシン (10 mg/ml) による減成後の溶解度。

所定期間の治療後、溶解部分を不溶解部分から遠心分離 (50,000 × g, 1時間) により分離し、各部分を凍結乾燥し、6 MのHCl で加水分解し、全ヒドロキシプロリンを決定した。その分析結果を第I表に示す。

系的コラーゲン架橋結合の増大を阻止すること、を示している。

実施例VI

上記実施例IVに記載されている同じ群の動物からの動脈試料を、酵素免疫アッセイ法により、コラーゲンに対するリポ蛋白質の架橋結合分析に使用した。ウサギにおけるラットアポリポ蛋白質-Bに対する抗血清、パーオキシダーゼをラベルした抗ラビット抗体、及び標準的な色素反応剤を用いて、結合した抗体の量を検出した。結果を以下の第II表に示す。

第 II 表

治療群 (コラーゲン)	mgあたりの結合したリポ蛋白質
正常動物	0.69
糖尿病動物	1.86
正常動物+アミノグアニジン	0.53
糖尿病動物+アミノグアニジン	0.64

これらのデータは、アテローム症初期における巨大血管系のリポ蛋白質蓄積が、アミノグアニジン投与により治療可能であることを示す。

実施例VII

このプロセスにおける高血圧症に由来する基質変化の積極的な役割を評価するために、生後35週のLong-Evansラットの無機質脱骨基質位を準備した。りん酸塩緩衝食塩水のみ (PBS)、AGE の種々の糖前駆体を含む (PBS-G) 及びPBS と、糖+AGE 阻害アミノグアニジン (PBS-G + AG) のそれぞれでこの骨基質を保温した。保温後、基質を正常ラットに皮下

第 I 表

溶解されるコラーゲンの比率 (%)

群	治療	高度グリコシル化生成物	0.5M HCl	CNBr	ペプシン
正常	なし	3.5 ± 0.11	8.0 ± 0.3	12.2 ± 0.1	50.9 ± 0.3
糖尿	なし	19.4 ± 0.8	2.0 ± 0.2	4.4 ± 0.1	15.0 ± 0.2
正常	7.5/77.5%	2.8 ± 0.1	18.7 ± 0.3	13.6 ± 0.3	52.5 ± 0.2
糖尿	7.5/77.5%	4.5 ± 0.1	12.6 ± 0.3	10.6 ± 0.1	46.1 ± 0.4

・ヒドロキシプロリン1mgあたり特定蛍光

第I表からわかるように、未治療糖尿ラットからの動脈結合組織における蛍光性の、高度非酵素的グリコシル化生成物の蓄積は、未治療正常ラットからの動脈組織よりも5.5倍大きい。これと対照的に、アミノグアニジン治療糖尿ラットからの動脈組織は、同じ期間同じ濃度の高血糖症にさらされたにもかかわらず、未治療正常ラットのその1.3倍に過ぎない。これらのデータは、高度非酵素的グリコシル化生成物の蓄積が、生体内で、アミノグアニジンにより阻害されること、を示している。

三つの特定の処理 (酢酸、CNBr、ペプシン) のそれぞれにより溶解された動脈結合組織の比率は、未治療糖尿ラットの場合、正常ラットのそれに比し著しく減じている。未治療ラットからの糖尿動脈結合組織は、酢酸溶解度により評価した場合正常ラットより架橋結合が9倍あり、CNBr消化の場合2.1倍、ペプシン消化による架橋結合は1.4倍である。

これと対照的にアミノグアニジン治療糖尿ラットの動脈結合組織は、同じ期間同じ濃度の高血糖症にさらされているにもかかわらず、正常ラットに比べ僅かに1.1乃至1.4倍架橋結合しているにすぎない。これらのデータは、アミノグアニジンが高血糖症に由来する生体内における非酵

移植した。移植して12日後、150mg/kgを注射して移植無機物化の状態を調べ、骨芽細胞機能を評価するためアルカリフォスファターゼ活性を測定した。複数の試料を固定し、包埋し、組織学的評価を行うため染色した。

高度グリコシル化最終生成物 (AGE) 前駆体グリコアルデヒドは、基質AGE含量 (特定蛍光による) を2倍以上増加させる一方、骨分化を90%以上阻害した。これと対照的にAGE阻害剤であるアミノグアニジンと共に保温した場合、蛍光は正常状態に減じ、骨分化は比較例の80%まで回復した。

実施例VIII

長期間 (12.7 ± 1.2 日) 糖尿病であるニュージーランド産白色ウサギを、赤血球 (RBC) 変形に及ぼす試験化合物の効果を調べるために使用した。赤血球成分におけるグルコースを介する架橋結合により、より変形の少い、より硬い膜を生じるようであれば、治療は、新しい赤血球におけるこの変化を防止するようものでなければならない。治療初期に既に存在している赤血球は治療の影響を受けることはない。なぜなら赤血球は、治療を受けているとしても、絶えず新しく生成される赤血球と取りかえられているからである糖尿ウサギ (n=6) の、2カ月の投与前及び投与後の平均血糖は236.6 プラスマイナス81.6mg/dl、であった。試験化合物は経口的に、100 mg/kg/日の割合で投与された。

変形指数 (DI) (堅固赤血球の緩衝液/減液における減比率、ヘマトクリット = 40 %) を赤血球変形の尺度として使用した。緩衝され堅固化された赤血球は、31℃で-20cmHgの圧力で、3µmの微細孔膜 (カナダブレザントンのヌクレオポア社製) によりろ過した。正常なニュージーランド産白色ウサギ (n=14) 各群 (年齢、性別、重量) の基準範囲は、

赤血球変形が1.67乃至1.84、平均1.82プラスマイナス0.13、%ヘモグロビングリコシル化が1.1から1.96、平均1.60プラスマイナス0.10であった。糖尿病のニュージーランド産白色ウサギに100 mg/kg/日の割合でアミノグアニジンを投与した結果を第III表に示す。

第 III 表

アミノグアニジンHCl を投与した長期糖尿病ウサギの赤血球変形指数

投与期間 (週)	赤血球変形指数
0	18.32 ± 6.03
4	1.17 ± 3.12
8	6.83 ± 2.97
12	4.64 ± 1.58
16	4.44 ± 1.33
20	4.14 ± 1.06

糖尿病は変形指数を1.0から1.8まで増大させる。上記の結果は、アミノグアニジン投与により、糖尿病に由来する変形値(変形指数)が12週後に正常値に戻る、ことを示す。これら実験動物の赤血球変形値は非正常値にはならなかった。これらの実験は、アミノグアニジンが糖尿病に由来する赤血球変形変化を防止すること、治療が遅れたウサギについては、既に架橋結合が生じておりより変形性のない古い赤血球と同様に、架橋結合を阻害するアミノグアニジンの影響により新しい赤血球と変えられるような効果がみられることを示している。

実施例IX

ストレプトゾトシン-糖尿病のオスのLewis ラットに対して9箇月間、

をすることが不可欠である。グルコース濃度が、ストレプトゾトシン-糖尿病動物のそれ(>500 mg%)よりもはるかに低い濃度な濃度(250 - 350 mg%)に維持されるのである。

糖尿病及び非糖尿病の対照ラットに、6箇月間、12.5及び50mg/kg/日の塩酸アミノグアニジンを経口投与した。対照ラットの一群には水のみを投与した。次いで実施例IIに記載したペプシン法により、尾部腱コラーゲンの溶解度を調べた。結果を第V表に示す。

第 V 表

条件	12.5% HCl (mg/kg/d)	コラーゲン溶解度
正常	0	38.1 ± 3.1 %
糖尿	0	61.1 ± 0.8 %
糖尿	12.5	66.1 ± 1.2 %
糖尿	50	75.9 ± 0.4 %
正常	50	88.2 ± 0.2 %

これらのデータは、6箇月糖尿病であるラット尾部腱コラーゲンの溶解度は11%から65%に減少していたが、共にアミノグアニジン治療により、投与量に応じ、著しく阻害されたこと、を示す。6箇月以上糖尿病である38/ウースターラットのコラーゲンは、ストレプトゾトシン-糖尿病ラットよりも、溶解度の減少が少い。これは、おそらく高血糖症の程度が低いこと、及び慢性的にコラーゲンがさらされていたグルコースの濃度が低いこと、によるとと思われる。

実施例XI

架橋結合の尺度であるウシ血清アルブミン(BSA)における蛍光のグル

毎日塩酸アミノグアニジンを、0、6.25、12.5、25、及び50mg/kg/日、の割合で投与する治療を行った。治療期間経過後、尾部腱組織のコラーゲンに溶解度決定処理を施した。10mgの試料を、1mgのペプシンを含む0.5Mの酢酸5-中で、4℃で5時間、ゆるやかにゆすりながら保温した。次いで試料を1時間、50.000×gで遠心分離し、溶解部分と不溶解部分を洗浄処理により分離した。各部分を6NのHClで加水分解し、ヒドロキシプロリンの全量を測定した。結果を下記第IV表に示す。

第 IV 表

条件	12.5% HCl 25 (mg/kg/d)	コラーゲン溶解
正常	0	80.7 ± 3.4 %
糖尿	0	61.1 ± 0.8 %
糖尿	12.5	66.1 ± 1.2 %
糖尿	50	75.9 ± 0.4 %
正常	50	88.2 ± 0.2 %

9箇月間の糖尿病により尾部腱コラーゲンの溶解度は91%から8%に減少したが、経口的に12.5から50mg/kg/日の割合で塩酸アミノグアニジンを投与することにより、投与量に応じこの変化を著しく阻害することができ、もっとも高い投与量の場合、糖尿病に由来する架橋結合の88%を防止した。

実施例X

コラーゲン架橋結合に及ぼすアミノグアニジン投与の効果を遺伝的に糖尿病である動物モデルとして38/Worcesterラットを用いて検査した。動物が一旦糖尿病になると、その生存のためには毎日インシュリンの注射

コースに媒介される進行を阻害する本発明化合物の能力を評価するため、以下の方法が採用された。1.5Mのりん酸ナトリウム緩衝液、pH 4、中に溶かした100 mMグルコース及び100 mg/ml BSAと共に、化合物を無菌条件下で1 mMの濃度で保温した。

保温混合物の試料を、蛍光測定のため31℃で一週間保温した。夫々の試験化合物について、対照例として化合物単独(C)、化合物+グルコース(G+C)、化合物+BSA(B+C)の緩衝液保温物をつくった。グルコースとBSAとの(B+G)保温物の別の組を化合物の阻害効果が測定された基準対照例として調製した。夫々の保温物を3組ずつつくった。

夫々の試料について、蛍光(励起、370 nm; 放出、440 nm)を、蒸留水で100倍に希釈した後で測定した。

夫々の試験化合物における褐色化の%阻害度を以下のように計算した。夫々のF値は、保温前に対する、1週間保温後の試料の蛍光測定値を要わず。

%阻害度 =

$$[F_{B+C} - (F_{B+C} - (F_C + F_{G+C} + F_{B+C})) \times 100] / F_{B+C}$$

式中、B=BSA、G=グルコース、C=試験化合物。

1 mMの種々の試験化合物による褐色化の%阻害度は以下の通りである。

41.0%	レージンモノヒドロクロライド;
28.1%	3-メルカプト-D-バリン;
16.1%	レーオルニチンモノヒドロクロライド;
31.5%	DL-2, 4-ジアミノブチル酸ジヒドロクロライド;
11.0%	レーシステインモノヒドロクロライド; 及び
30.2%	4-アミノブチル酸

実施例XII

錠剤	g/錠剤中
式Iの化合物	50
澱粉	50
マンニトール	50
ステアリン酸マグネシウム	2
ステアリン酸	5

化合物、澱粉及びラクトースを混合し、澱粉ペーストで含湿粒状化した。粒状物をトレイ上に置き、45℃の温度で一晩放置して乾燥させた。乾燥した粒状物を粉砕機で粉砕して約10メッシュの粒子径とした。ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、残りを澱粉、としてこれらを添加し、適当な錠剤プレスで圧縮する前に混合した。錠剤を、41gの固さを有する11/32"パンチで111gの重さに圧縮した。これら錠剤は、USP XVIに記載されている方法によれば、半時間で分解する。

実施例XIII

ローション	g/g
式Iの化合物	1.0
エチルアルコール	100.0
ポリエチレングリコール400	300.0
ヒドロキシプロピルセルロース	5.0
プロピレングリコール	全体で100gをつくるための残り分

に覆われた歯表面のかわりに、露出していない現像済写真用紙を、紙を裏打ちされた固定蛋白質（ゼラチン；即ちコラーゲン）面をつくるために使用した。5ミリメートルの円をパンチし、3mMのナトリウムアジドを含む100 mMグルコース-6-リン酸塩と0.5 Mリン酸緩衝液（pH=7.4）の溶液中に、一週間、50℃で浸漬した。グルコース-6-リン酸塩は、グルコースよりも早い速度で行われる非酵素的褐色化に関与する成分である。グルコース-6-リン酸塩に加え、クロロヘキシジン及び/もしくは式Iの化合物を加える。保温後、このゼラチン紙ディスクを水ですすぎ、褐色を観察し、写真にとった。

グルコース-6-リン酸塩単独でディスクを保温した場合、緩衝液のみの中に浸した場合よりも、速かに褐色化していた。クロロヘキシジン（最終濃度が0.04%クロロヘキシジンである登録商標名Pari-dol）を含有させた場合、褐色が際立っていた。式Iの化合物をクロロヘキシジンに添加した場合、クロロヘキシジンを使用することなく式Iの化合物を含めた場合と同様に、ゼラチンの褐色化を阻害した。

ゼラチン面上におけるグルコース-6-リン酸塩の作用による速やかな褐色化と、式I化合物によるその阻害は、本発明が、歯表面の非酵素的褐色化を防ぐために有用である、ことを示している。クロロヘキシジンを使用した場合に褐色化が増大すること、及び式I化合物でその褐色化が阻害されること、はシクロヘキシジンと共に生じる耐ブラク病で増大する非酵素的褐色化を、本発明化合物が有効に防止しうることを示している。

本発明は、その基本的な特徴を失うことなく、他の形態又は他の方法でも実施できる。明細書の説明は従って限定的なものではなく本発明を理解するためのものであり、均等の範囲に入る変更はすべて本発明請求の範囲に含まれる、と理解されるべきである。

実施例XIV

経口リンス	
式Iの化合物	1.4%
グルコン酸クロロヘキシジン	0.12%
エタノール	11.6%
ナトリウムサッカリン	0.15%
FD&C Blue 1号	0.001%
ペパーミントオイル	0.5%
グリセリン	10.0%
Tween 60	0.3%
水を加えて	100%

実施例XV

歯みがき	
式Iの化合物	5.5%
ソルビトールの70%水溶液	25%
ナトリウムサッカリン	0.15%
ナトリウムラウリルスルフェート	1.15%
Carpol 931 (6%水分散液)	15%
スペアミントオイル	1.0%
水酸化ナトリウム (50%水溶液)	0.76%
二塩基カルシウムフォスフェートジハイドレート	45%
水を加えて	100%

歯の表面などに生じる蛋白質変色を防止するための非酵素的褐色化の阻害剤の能力を更に研究するため、以下の表面褐色化実験を行った。歯膜

国際調査報告

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		2. NUMBER OF PAGES
1st. Cl. 5 A 61 K 11/195		2. 11
3. FIELD SEARCHED		
Classification System	Classification System	
1st. Cl. 5 A 61 K		
4. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Number of Documents	Abstract in Chinese
X	EP.A.0222313 (THE ROCKEFELLER UNIVERSITY) 20 May 1987 see the whole document	1-5, 11-14, 40-42
X	EP.A.0327919 (THE ROCKEFELLER UNIVERSITY) 16 August 1989 see abstract see page 7, line 15 - line 44 see page 9, line 30 - line 36; claims 1-5, 8-9	1-5, 11-14
X	EP.A.0316452 (THE ROCKEFELLER UNIVERSITY) 24 May 1989 see abstract see page 6, line 16 - line 21 see page 9, line 53 - page 10, line 6; claims 1, 3, 4	1-4, 11-13, 40-41
5. OTHER INFORMATION		
6. CERTIFICATION		
Date of the Search Report		Date of the Search Report
01-04-1993		04.11.93
Examiner's Name		Examiner's Name
EUROPEAN PATENT OFFICE		EUROPEAN PATENT OFFICE

International Application No. PCT/US 93/00709

IN DOCUMENTS (EPHRAZOL) TO SA BAA/AFI (CONTINUED FROM THE PREVIOUS SHEET)

Country	Number of Documents, with indication, where appropriate, of the relevant category	Reference to Date No.
X	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY vol. 254, no. 15, 1983, pages 9406 - 9412 A.S. EBLE ET AL. 'MONOZYMATIC GLUCOSYLATION AND GLUCOSE-DEPENDENT CROSS-LINKING OF PROTEIN' cited in the application see the whole document	1-5
X	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY vol. 264, no. 36, 1989, pages 21597 - 21602 D.R. SELL ET AL. 'STRUCTURE ELUCIDATION OF A SENSITIVE CROSS-LINK FROM HUMAN EXTRACELLULAR MATRIX' cited in the application see the whole document	1-5
X	J.E.F. REYNOLDS 'MARTINDALE THE EXTRA PHARMACOPOEIA' 1989, THE PHARMACEUTICAL PRESS, LONDON see page 1267 "lysine hydrochloride"	32-34, 40-42
A	THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE vol. 318, no. 20, 1988, pages 1315 - 1321 M. BROWNLEE ET AL. 'ADVANCED GLYCOSYLATION END PRODUCTS IN TISSUE AND THE BIOCHEMICAL BASIS OF DIABETIC COMPLICATIONS' see the whole document	1-5, 11-14, 40-42

Form PCT/US 93/00709 (continued from previous sheet)

International Application No. PCT/US 93/00709

国際調査報告

Section I: Observations where article 17(1) of the Patent Cooperation Treaty is applicable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has been established in respect of an international search report (ISR) under the following request:

1. ☒ **Classical search:**
The search was carried out in accordance with the request of the applicant, namely:
REMARK: Although claims 1-31 are directed to a method of treatment of the human/animal body the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. ☐ **Classical search:**
The search was carried out in accordance with the request of the applicant, namely:
REMARK: The search was carried out in accordance with the request of the applicant, namely:
REMARK: The search was carried out in accordance with the request of the applicant, namely:

3. ☐ **Classical search:**
The search was carried out in accordance with the request of the applicant, namely:
REMARK: The search was carried out in accordance with the request of the applicant, namely:

Section II: Observations where article 17(2) of the Patent Cooperation Treaty is applicable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has been established in accordance with the request of the applicant, namely:

For further information please see form PCT/ISA/206 dated 03.6.93

4. ☐ As all relevant additional search fees were timely paid by the applicant, the international search report covers all available claims.

5. ☐ As all available claims could be searched without effort, and/or on request for, the Authority did not incur payment of any additional fee.

6. ☐ As only some of the relevant additional search fees were timely paid by the applicant, the international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims 1-5.

7. ☒ As relevant additional search fees were timely paid by the applicant, the international search report is restricted to the claims for which fees were paid, specifically claims 1-5.

1-14, 11-33 40, 41 (PARTIALLY); 5 34, 42 (COMPLETELY)

Remarks on Prior Art

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's request.

☐ The present international search report is based on the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/206 (Continuation of first sheet) (12 July 1992)

国際調査報告

US 9300709
SA 70032

This report sets the present family members relating to the present international search report. The members are as indicated in the European Patent Office (EPO) file no. 9300709. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Parent document cited in search report	Publication date	Parent family members	Publication date
EP-A- 0222313	20-05-87	US-A- 4758583	19-07-88
		AU-B- 610056	16-05-91
		AU-A- 6495886	21-05-87
		CA-A- 1294218	14-01-92
		JP-A- 3103163	30-04-91
		JP-A- 62142174	25-06-87
		US-A- 4908446	13-03-90
		US-A- 5175192	29-12-92
		US-A- 5140048	18-08-92
		US-A- 5108077	21-04-92
		US-A- 5114943	19-05-92
		US-A- 5218001	08-06-93
		US-A- 5202424	13-04-93
		US-A- 5238963	24-08-93
		US-A- 5221683	22-06-93
EP-A- 0327919	16-08-89	US-A- 4978684	18-12-90
		AU-A- 2893589	03-08-89
		JP-A- 2056413	26-02-90
		US-A- 5128122	07-07-92
		US-A- 5096703	17-03-92
EP-A- 0316852	24-05-89	US-A- 4908446	13-03-90
		US-A- 4983604	08-01-91
		AU-B- 622419	09-04-92
		JP-A- 2000156	05-01-90
		US-A- 4978684	18-12-90
		US-A- 5128122	07-07-92
		US-A- 5140048	18-08-92
		US-A- 5096703	17-03-92
		US-A- 5221683	22-06-93

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 31/195	A D A		

(72) 発明者 セラミ、アンソニー
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 11964
シェルタ アイランド、ラム アイラ
ンド ドライヴ (番地なし)